

本文引用:李洁花,廖晨希,杨盾,曾友,黄丹,张熙,刘春华,谢明霞. 基于古汉愈疡方的不同剂型对糖尿病大鼠溃疡创面愈合疗效的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(4): 548-556.

基于古汉愈疡方的不同剂型对糖尿病大鼠 溃疡创面愈合疗效的比较研究

李洁花¹, 廖晨希¹, 杨盾¹, 曾友¹, 黄丹¹, 张熙¹, 刘春华^{2*}, 谢明霞^{1*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙 410005)

〔摘要〕目的 观察“古汉愈疡方”对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面的修复作用,探讨其促进创面愈合的作用机制,并比较其凝胶剂与喷雾剂的疗效。方法 将80只SPF级健康成年雄性SD大鼠,随机分为对照组(15只)和糖尿病组(65只),糖尿病组大鼠采用一次性腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病模型,造模成功的60只糖尿病大鼠与15只对照组的正常大鼠一起制作皮肤溃疡模型,对照组予凡士林纱布换药,糖尿病组大鼠再随机分为模型组、古汉愈疡方喷雾治疗组(以下简称喷雾组)、古汉愈疡方凝胶治疗组(以下简称凝胶组)、康复新液治疗组(以下简称康复新组),每组15只,分别予以凡士林纱布、古汉愈疡方喷雾剂、古汉愈疡方凝胶、康复新液干预,每日换药1次,持续21d。肉眼观察各组大鼠创面愈合情况,并计算3、7、14、21d动态创面收缩率,HE染色观察大鼠创面组织病理学变化,免疫组化检测胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的蛋白表达。结果 (1)给药3、7、14、21d时,对照组、喷雾组、凝胶组和康复新组创面收缩率均显著高于模型组($P<0.01$),凝胶组显著高于喷雾组($P<0.01$);给药21d时,凝胶组与康复新组、对照组的创面收缩率差异无统计学意义($P>0.05$)。(2)HE染色显示,模型组创面化脓,有炎性渗出液,创面缩小缓慢;相较模型组,对照组和凝胶组新鲜肉芽组织明显增生,毛细血管生长迅速,成纤维细胞数量明显增多,炎症细胞浸润明显减少,喷雾组和康复新组次之。(3)免疫组化结果显示,与模型组比较,其余4组在各时间点创面组织中IGF-1的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与对照组比较,凝胶组各时间点IGF-1的蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而7、21d喷雾组与康复新组IGF-1的蛋白表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),14d对照组、喷雾组与康复新组差异无统计学意义($P>0.05$);与凝胶组比较,喷雾组与康复新组在各时间点IGF-1的蛋白表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,其余4组在各时间点创面组织中VEGF的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与对照组比较,喷雾组、凝胶组与康复新组VEGF的蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);与凝胶组比较,康复新组VEGF的蛋白表达水平在14d偏低($P<0.05$),喷雾组VEGF的蛋白表达水平在21d偏低($P<0.05$)。结论 “古汉愈疡方”可有效促进糖尿病皮肤溃疡大鼠创面的修复,其疗效机制可能与上调IGF-1及VEGF的表达有关,且凝胶剂比喷雾剂疗效更佳。

〔关键词〕 糖尿病;古汉愈疡方;皮肤溃疡;胰岛素样生长因子;血管内皮生长因子;大鼠

〔中图分类号〕 R285

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.04.006

Comparative study on the therapeutic effect of different dosage forms of Guhan Yuyang Recipe on ulcer wound healing in diabetic rats

LI Jiehua¹, LIAO Chenxi¹, YANG Dun¹, ZENG You¹, HUANG Dan¹, ZHANG Xi¹, LIU Chunhua^{2*}, XIE Mingxia^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔收稿日期〕 2021-09-30

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2021JJ80060);湖南省大学生创新基金项目(20212450,20202626);湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ004,2018XJJ26)。

〔第一作者〕 李洁花,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治内分泌疾病。

〔通信作者〕 * 谢明霞,女,博士,E-mail:xiemingxia0618@163.com;刘春华,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:Amy12302006@126.com。

[Abstract] Objective To observe the effect of "Guhan Yuyang Recipe" on wound healing of diabetic skin ulcer rats, to explore its mechanism of promoting wound healing, and to compare the curative effect of gel and spray. **Methods** 80 SPF grade healthy adult male SD rats were randomly divided into control group ($n=15$) and diabetic group ($n=65$). The diabetic model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. 60 diabetic rats successfully established and 15 normal rats in the control group were used to make skin ulcer model, and the control group was treated with vaseline gauze. Diabetic rats were randomly divided into model group, Guhan Yuyang Recipe spray treatment group (hereinafter referred to as spray group), Guhan Yuyang Recipe gel treatment group (hereinafter referred to as gel group) and Kangfuxin liquid treatment group (hereinafter referred to as Kangfuxin group), with 15 rats in each group. The rats were treated with vaseline gauze, Guhan Yuyang Recipe spray, Guhan Yuyang Recipe gel and Kangfuxin liquid respectively, and the dressing was changed once a day for 21 days. The wound healing of rats in each group was observed with naked eye, and the dynamic wound contraction rate at 3rd, 7th, 14th and 21st day was calculated. The histopathological changes of wounds were observed by HE staining, and the protein expression levels of insulin like growth factor-1 (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by immunohistochemistry. **Results** (1) On the 3rd, 7th, 14th and 21st day after administration, the wound contraction rate in the control group, spray group, gel group and Kangfuxin group was significantly higher than that in the model group ($P<0.01$), and that in the gel group was significantly higher than that in the spray group ($P<0.01$); on the 21st day of administration, there was no significant difference in wound contraction rate between the gel group, the Kangfuxin group and the control group ($P>0.05$). (2) HE staining showed that the wound in the model group suppurated, there was inflammatory exudate, and the wound shrank slowly; compared with the model group, fresh granulation tissue proliferated significantly, capillaries grew rapidly, fibroblasts increased and inflammatory cell infiltration decreased significantly in the control group and gel group, followed by spray group and Kangfuxin group. (3) The results of immunohistochemistry showed that, compared with the model group, the protein expression level of IGF-1 in the other four groups increased significantly at each time point ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with the control group, the protein expression level of IGF-1 in the gel group was higher at each time point ($P<0.05$ or $P<0.01$), on the 7th and 21st day, the protein expression level of IGF-1 in spray group and Kangfuxin group was lower than that in control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), on the 14th day, there was no significant difference among control group, spray group and Kangfuxin group ($P>0.05$); compared with gel group, the protein expression of IGF-1 in spray group and Kangfuxin group was significantly decreased at each time point ($P<0.01$). Compared with the model group, the protein expression level of VEGF in the wound tissue of the other four groups increased significantly at each time point ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with the control group, there was no significant difference in the protein expression level of VEGF among spray group, gel group and Kangfuxin group ($P>0.05$); compared with gel group, the protein expression level of VEGF in Kangfuxin group was lower on the 14th day ($P<0.05$), and that of VEGF in the spray group on the 21st day ($P<0.05$). **Conclusion** "Guhan Yuyang Recipe" can effectively promote the wound repair of diabetic skin ulcer rats. The mechanism of its curative effect may be related to the up-regulation of the expression of IGF-1 and VEGF, and the curative effect of gel is better than that of spray.

[Keywords] diabetes mellitus; Guhan Yuyang Recipe; skin ulcer; insulin-like growth factor; vascular endothelial growth factor; rat

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种以高血糖为特征的代谢性疾病, 根据世界卫生组织发布的一项流行病学调查显示, 到 2030 年, 全球成年人 (20~79 岁) 糖尿病患病率将从 2010 年的 6.4% 上升到 7.7%^[1]。目前, 世界上有高达 20% 的糖尿病患者出现糖尿病皮肤溃疡^[2], 糖尿病性溃疡现已成为慢性难

愈性创面的首要病因^[3], 严重危害着糖尿病患者的身心健康, 使患者生活质量显著降低, 给其家庭带来沉重的经济负担和巨大的生存压力, 同时, 还造成极大的医疗资源损耗。因此, 研发促进糖尿病皮肤溃疡愈合的药物刻不容缓。胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 是参与细胞肉芽

形成和再上皮化的合成胰岛素样生长因子的多肽之一^[4],血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是调控血管新生的主要因子^[5],二者在糖尿病溃疡创面愈合中起着重要作用。

项目组前期已开展了糖尿病足溃疡的中药内服、外用治疗研究^[6]。近年来,名老中医药专家王净净教授受马王堆汉墓出土的《五十二病方》治“痈”“疽”用药思路启发^[7],突破“清热解毒、去腐生肌”的固有思维模式,创建出“温、补、清、消”法兼施的“古汉愈疡方”,该方最初作为中药沐足方用于临床治疗糖尿病足溃疡,疗效满意,后将其改良为便携的凝胶剂和喷雾剂进行研究,具体临床数据正在整理中,并已申报相关专利。本实验通过观察“古汉愈疡方”对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面的修复作用,以公认的促进各种溃疡愈合的有效药物康复新液作为阳性对照药,初步探讨“古汉愈疡方”促进糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的作用机制,并比较其凝胶剂与喷雾剂的疗效差异,为临床应用及剂型开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级SD大鼠80只,雄性,体质量250~280g,由湖南中医药大学动物实验中心[动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009]代购于湖南长沙斯莱克景达实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004]。饲养于湖南中医药大学动物实验中心SPF级动物房,各组分笼饲养,饲养期间室温控制在20~24℃,湿度50%~70%,定时给予标准饲料与纯净水。适应性喂养1周后进行实验。实验程序由湖南中医药大学实验动物伦理委员会标准批准(编号:LL2019110701)。

1.2 药品与试剂

“古汉愈疡方”药材购自湖南中医药大学附属中西医结合医院中药房,经医院制剂中心质检科严格鉴定,符合《中华人民共和国药典》和《中华人民共和国卫生部药品标准》的规定。“古汉愈疡方”凝胶剂:将卡波姆940加入适量蒸馏水中,放置过夜,使其充分溶胀,于搅拌下加入三乙醇胺,制成凝胶基质。另将“古汉愈疡方”提取物、羟苯乙酯溶于丙二醇及乙醇中,于搅拌下加入凝胶基质中,再加蒸馏水至足量,搅匀,即得,装罐密封,钴-60辐照(剂量为5kGy,符合《辐照食品卫生管理办法》)灭菌,低温(4℃左

右)保存备用。“古汉愈疡方”喷雾剂:将“古汉愈疡方”提取液浓缩后加入0.3%苯甲酸钠,搅匀即得,装喷雾瓶密封,钴-60辐照灭菌,低温(4℃左右)保存备用。康复新液购自湖南科伦制药有限公司,批号:M171125。

链脉佐菌素(streptozocin, STZ, 北京索莱宝科技有限公司,批号:928T020);10%水合氯醛(Wabcan公司,批号:ST1002)。

1.3 主要仪器

CX23型光学显微镜(日本Olympus公司);CM3050S型冰冻切片机(德国Leica公司);KD-BM II电脑生物组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);HM325石蜡切片机(Thermo Scientific公司);YD-A生物组织摊片机(金华市益迪医疗设备有限公司);尼康D7100数码相机(日本Nikon株式会社);电子天平(北京六一仪器厂);三诺GA-3血糖仪和血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司)。

1.4 造模方法

1.4.1 制作糖尿病大鼠模型^[8] 所有大鼠禁食不禁水20h,将STZ溶于0.1mmol/L柠檬酸钠缓冲液(pH4.2~4.5),配制成1%溶液,随机选取15只作为对照组,其余65只大鼠称重后,按STZ 50mg/kg一次性腹腔注射诱导糖尿病模型,并分别于STZ腹腔注射前1天及注射后第3、7、14天取大鼠尾静脉血,检测随机血糖。以注射后第3天的随机血糖值大于16.7mmol/L,且稳定2周,并表现出明显的多饮、多食及多尿者,判定为糖尿病大鼠模型成功。共造模成功62只,成模率95.38%,死亡率1.54%。

1.4.2 制作皮肤溃疡模型^[9] 筛选出糖尿病造模成功的所有糖尿病大鼠与对照组的15只正常大鼠一起制作皮肤溃疡模型,大鼠予以麻醉后俯卧位固定,脱毛,造模区(颈后脊柱区)用直径15mm的圆形打孔器标记造模面积,在严格无菌操作技术下,用外科方法剪去标记好的造模区皮肤,深达皮下筋膜,制成皮肤缺损开放性创面的大鼠皮肤溃疡模型,以无菌纱布覆盖,医用胶带固定,分笼饲养。

1.5 分组与给药方法

对照组15只予凡士林纱布覆盖创面。随机选取皮肤溃疡模型成功的60只糖尿病大鼠按血糖水平编号,采用随机数字表法随机分为4组,分别为模型组、古汉愈疡方喷雾治疗组(以下简称喷雾组)、古汉愈疡方凝胶治疗组(以下简称凝胶组)、康复新液治

疗组(以下简称康复新组),每组 15 只。模型组予凡士林纱布覆盖创面;喷雾组喷适量“古汉愈疡方”喷雾剂,并用内侧沾有“古汉愈疡方”喷雾剂的无菌纱布覆盖创面;凝胶组涂抹适量“古汉愈疡方”凝胶,并用内侧沾有“古汉愈疡方”凝胶的无菌纱布覆盖创面;康复新组涂抹康复新液,并用内侧沾有康复新液的无菌纱布覆盖创面。各组大鼠每日换药 1 次,祛除创口硬痂,使用聚维酮碘消毒,连续换药 21 d。

1.6 创面愈合情况及动态收缩率的测定

分别于给药后 0、3、7、14、21 d 观察各组大鼠溃疡创面愈合情况,用数码相机在固定高度、固定焦距、固定标尺下拍照,并用 Imagepro Plus 6.0 软件计算创面收缩面积及创面收缩率^[10]。创面收缩率(%)=(初始创面面积-观察日创面面积)/初始创面面积×100%。

1.7 标本采集与制备

分别在换药后 7、14、21 d 随机选取 5 只大鼠的创面肉芽组织,固定于 4%多聚甲醛中,然后脱水、包埋、切片,分别做 HE 染色和免疫组织化学检测。

1.8 HE 染色观察创面肉芽组织病理变化

取各组大鼠的创面肉芽组织,置于 4%多聚甲醛中固定 48 h 后用蒸馏水清洗,置于不同浓度的乙醇中进行梯度脱水,制作组织蜡块,冰上预冷切片,二甲苯脱蜡 30 min,在不同浓度梯度的乙醇溶液中复水,使用苏木精和伊红染液分别染细胞核和细胞质,脱水、透明后用中性树胶封片,在光镜下观察 7、14、21 d 不同组间溃疡创面新鲜肉芽组织、毛细血管生长分布、成纤维细胞形态数量及炎症细胞浸润等情况。

1.9 免疫组化检测 IGF-1 和 VEGF 的蛋白表达

免疫组化实验严格按照说明书操作,进行脱蜡至水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,封闭,加入一抗、二抗,DAB 显色(阳性为棕黄色),脱水封片等,制片后采用光学显微镜进行观察分析。每张切片随机抽取 5 个互不重叠的视野观察照相,图片使用 Imagepro Plus 6.0 软件分析,测定单位面积阳性细胞表达的光密度值,并计算平均光密度值(图片上各点的光密度值累加起来得到的 IOD 值与相应的目标区域内的面积 Area 的比值)作为每张切片该蛋白的表达情况。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计分析软件进行数据处理。

实验数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,先进行正态分布检验:符合正态分布者,两组间比较采用成组 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布者采用非参数检验。均以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 创面愈合情况及动态收缩率

创面形态学表明,随着时间的推移,对照组大鼠创面逐渐缩小,21 d 创面完全愈合,瘢痕几乎不可见;模型组创面化脓,3 d 稠液渗出量较多,7 d 形成干燥黄色脓痂,14 d 创面缩小缓慢,21 d 创面仍未完全愈合、有鲜红色肉芽生长;喷雾组和凝胶组创面呈向心性生长,有黑色血痂覆盖,其中凝胶组创面愈合速度较喷雾组更快,7 d 创面明显缩小、肉芽组织生长良好,14 d 创面大部分上皮化,21 d 创面完全愈合、瘢痕较喷雾组更小;康复新组愈合速度较凝胶组缓慢,21 d 创面尚未完全愈合;与对照组同时点比较,除 21 d 凝胶组与之比较,差异无统计学意义($P>0.05$)外,给药 3、7、14、21 d 各组创面收缩率均显著偏低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组同时点比较,给药 3、7、14、21 d 时,对照组、喷雾组、凝胶组和康复新组创面收缩率均显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$);与凝胶组同时点比较,除 21 d 康复新组与之比较,差异无统计学意义($P>0.05$)外,喷雾组与康复新组创面收缩率均显著偏低,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图 1-2。

2.2 创面肉芽组织的病理变化

HE 染色结果显示,喷雾组和康复新组可见大量新生的成纤维细胞和扩张的毛细血管,组织结构紧密,还有新生毛囊组织生成,二者与模型组相比,炎症细胞浸润较少;对照组和凝胶组中上述现象更为显著,新鲜肉芽组织明显增生,毛细血管生长迅速,成纤维细胞数量明显增多,炎症细胞浸润明显减少,促使组织结构紧密。见图 3。

2.3 创面肉芽组织 IGF-1 和 VEGF 的蛋白表达情况

免疫组织化学结果显示,随着时间的推移,各组创面肉芽组织 IGF-1 的蛋白表达水平在 7 d 达峰值后逐渐下降。与模型组比较,其余 4 组在各时间点创面组织中 IGF-1 的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与对照组比较,凝胶组各时间点 IGF-1 的蛋白表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 7 d、21 d 喷雾组与康复新组 IGF-1 的蛋白表达水平低于对照组,差异有统

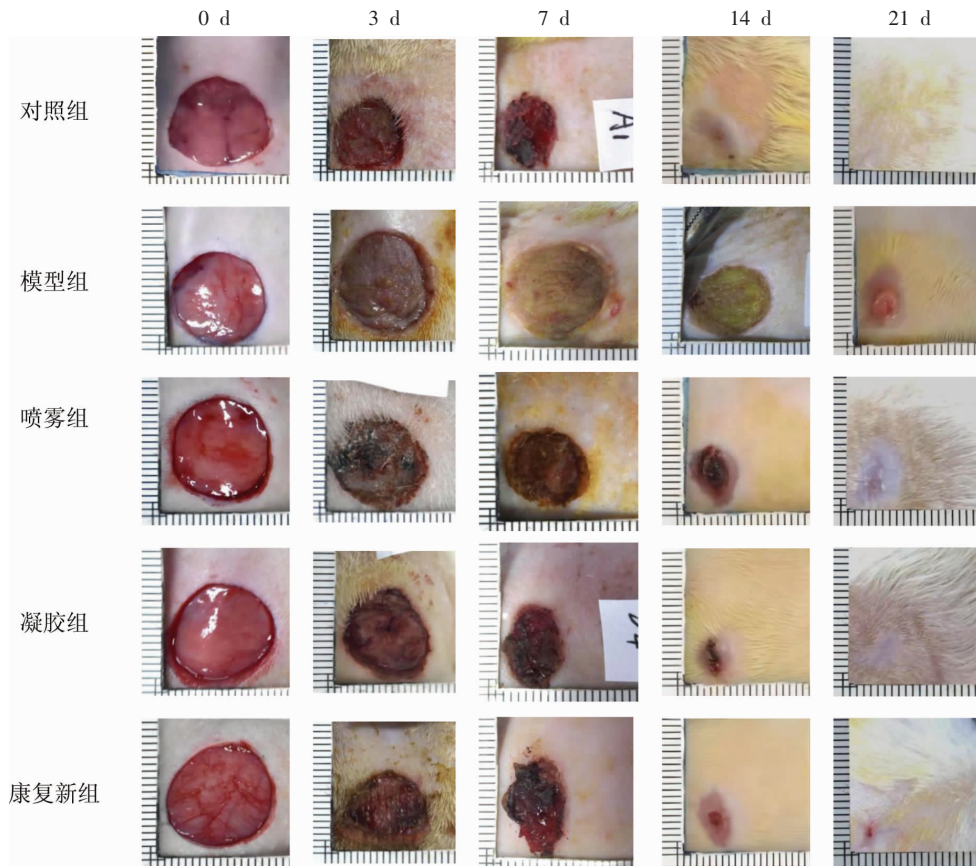
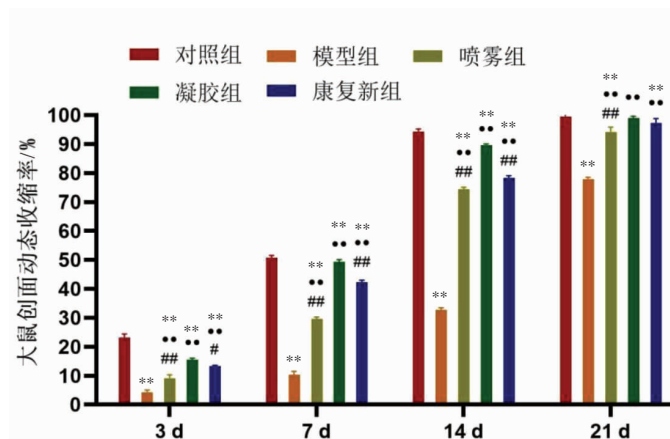


图 1 各组大鼠不同时间点皮肤溃疡创面愈合情况



注:与同时时间点对照组比较,** $P<0.01$;与同时时间点模型组比较,● $P<0.01$;与同时时间点凝胶组比较,
$P<0.05$,## $P<0.01$

图 2 各组大鼠不同时间点的创面动态收缩率比较

计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),14 d 对照组、喷雾组与康复新组三者差异无统计学意义($P>0.05$);与凝胶组比较,喷雾组与康复新组在各时间点 IGF-1 的蛋白表达均降低($P<0.01$)。各组创面肉芽组织 VEGF 的蛋白表达水平均渐增至 14 d 达峰值后逐渐下降,且除模型组外,其余 4 组 VEGF 的蛋白表达均处于稳定、较高水平。与模型组比较,其余 4 组在各时间点创面组织中 VEGF 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与对照组比较,喷雾组、凝胶组与康复新组 VEGF 的蛋白表达水平差异无统计学意义

($P>0.05$);与凝胶组比较,康复新组 VEGF 的蛋白表达水平在 14 d 偏低,差异有统计学意义($P<0.05$),喷雾组 VEGF 的蛋白表达水平在 21 d 偏低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4-6。

3 讨论

糖尿病皮肤溃疡属中医学“溃疡”“疮疡”“坏疽”“脱疽”“顽疮”等范畴,是临床常见、治疗棘手的糖尿病并发症,有迁延不愈、反复发作的特点,其多因消渴日久、气血阴阳俱损、气血不能畅行,本虚而六淫

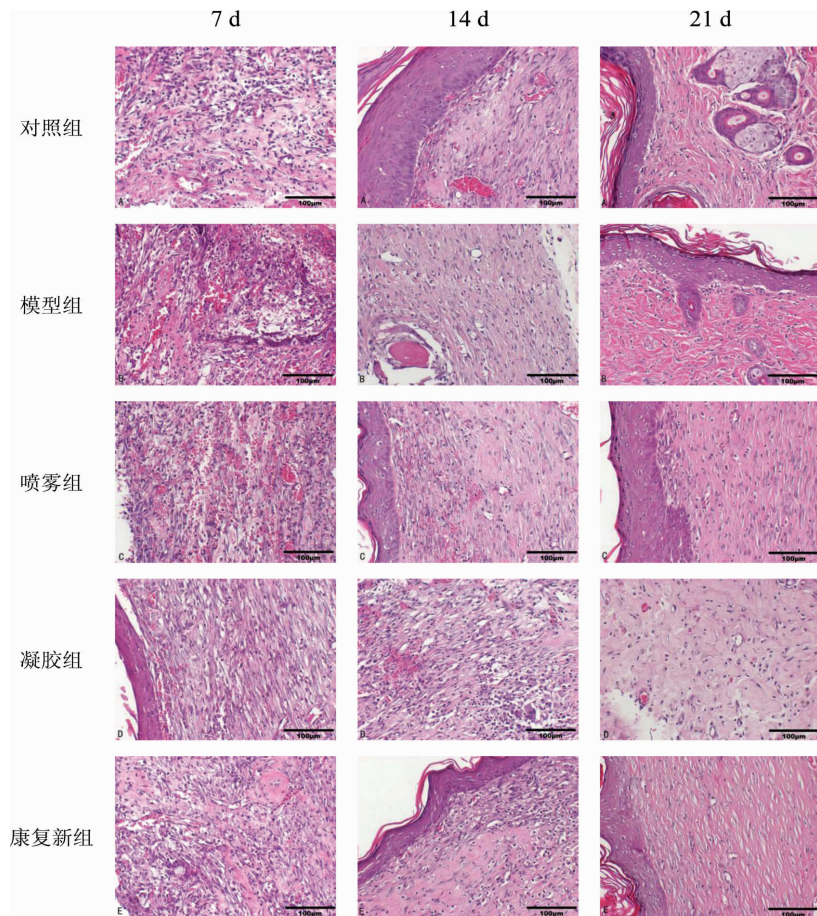


图3 各组大鼠不同时间点创面肉芽组织病理变化的比较(HE,×200)

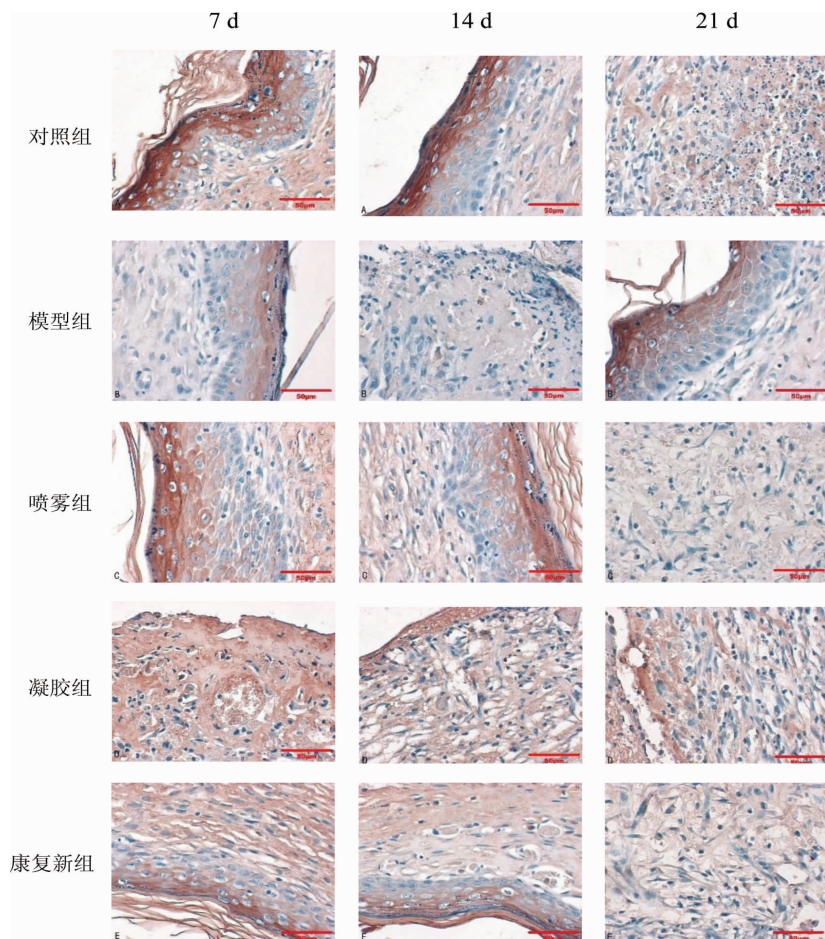


图4 各组大鼠不同时间点创面组织 IGF-1 蛋白表达的比较(免疫组化,×400)

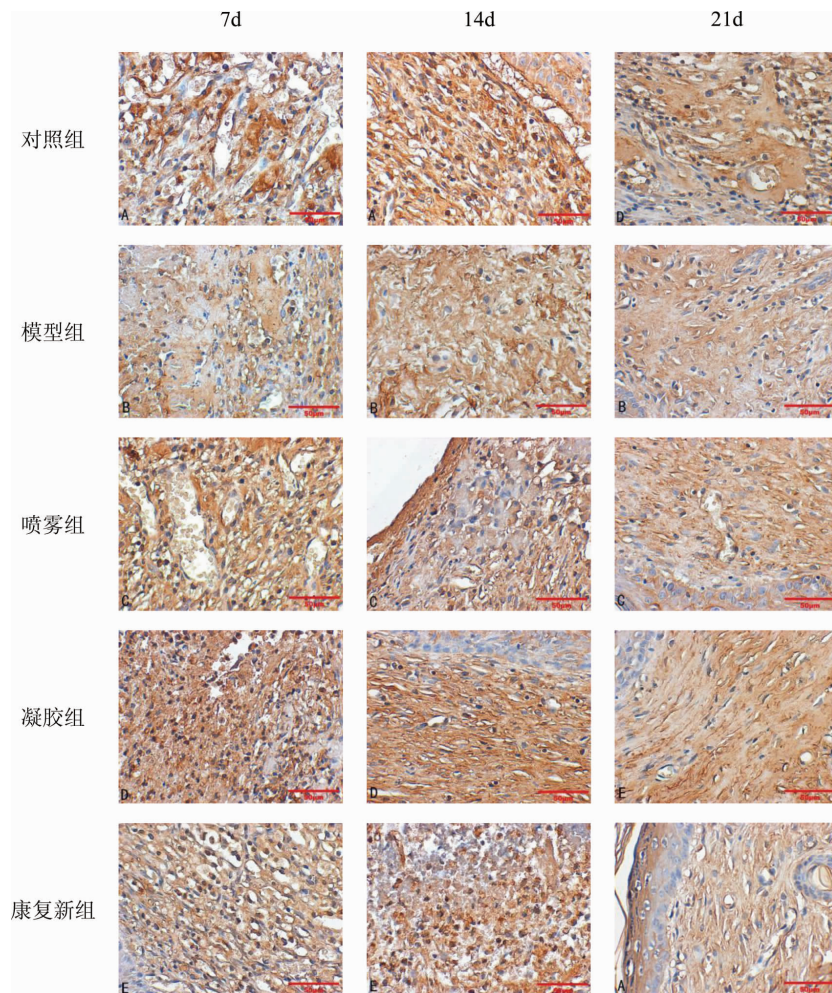
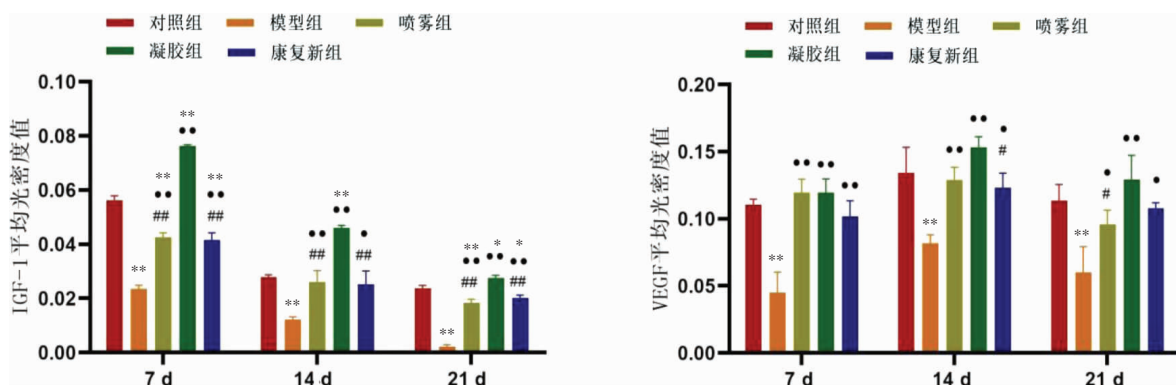


图5 各组大鼠不同时间点创面组织 VEGF 蛋白表达的比较(免疫组化, $\times 400$)



注:与同时点对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与同时点模型组比较, $\bullet P < 0.05$, $\bullet\bullet P < 0.01$;与同时点凝胶组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

图6 各组大鼠不同时间点创面组织 IGF-1 和 VEGF 平均光密度值的比较

外邪侵袭,并由于郁、瘀、痰、浊错综复杂,损伤四末而发病^[1]。宗文静等^[2]认为痰瘀在糖尿病发生发展过程中起着重要作用,若糖尿病患者皮肤脉络瘀阻,皮肤失去气血濡养,可出现瘙痒、溃疡等多种皮肤病变。中医药在治疗糖尿病皮肤溃疡上一直未停下研究的脚步,如杜文玉等^[3]发现广泛外用严重或难治性皮肤溃疡的金创抗菌膏也可有效治疗糖尿病大鼠的皮肤溃疡。中医药在治疗及研究方面总结出

“益气养阴,清热解毒,化瘀祛腐,活血通络”等治法^[4],但这些治法有其局限性,临床疗效不甚满意。因此,需要从不同的思路进一步探讨糖尿病皮肤溃疡的中医药治疗。王净净教授系全国第五批名老中医药专家学术经验继承工作指导老师、国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室指导专家,其受马王堆汉墓出土的《五十二病方》治“痈”“疽”用药思路启发^[7],创建出“温、补、清、消”法兼施的“古

汉愈疡方”，方由肉桂、干姜、黄芪、白芍、白薇、白及、泽兰等多味药组成。肉桂、干姜均为辛甘大热之品，用之可散寒温阳、通畅气血，著名的用于治疗“阴疽”的阳和汤就含有此二者，此乃“温”法。赵光明等^[15]研究发现，肉桂、干姜等回阳生肌方药能通过促进创面毛细血管和肉芽组织的生成来加快创面愈合。黄芪补气，有良好的托毒生肌功效，为治疗气血不足所致痈疽不溃、溃久不敛之要药，《神农本草经》曰：“黄芪，味甘，微温。主痈疽，久败创，排脓、止痛……补虚，小儿百病”，加白芍养血敛阴，此乃“补”法。已有文献证实，黄芪中的黄芪多糖具有免疫调节、增强抵抗力、抗炎、抗糖尿病以及促进与血管新生、组织修复有关的生物活性等作用，可能在炎症和组织重塑的不同阶段，通过多个途径参与修复过程，促进糖尿病难愈性创面愈合^[16]。余玲等^[17]通过临床观察得出黄芪桂枝汤可改善微炎症反应，促进周围感觉神经功能的恢复，明显提高患者临床疗效，显著缩短其疗程。白薇味苦、咸，性寒，其所长为既清实热，又退虚热，还有解毒疗疮之效，此乃“清”法。泽兰可活血祛瘀、散滞消肿，《玉楸药解》谓之“一切痈疽癰疽、金创扑打、吐衄诸证皆医”。白及味苦、涩，有寒凉苦泄之性，可收敛止血、消肿生肌，用治疮痈肿毒更是无论未溃已溃都可运用，若是疮痈初起，可消痈散结，若是疮痈已溃，又可止血生肌，此乃“消”法。雷霆等^[18]研究证明了三七-白及胶海绵外敷于糖尿病足溃疡创面后可有效促进创面的愈合。“古汉愈疡方”诸药合用，诸法共施，兼具“益气活血、温阳通络、清热解毒、去腐生肌”等多重功效，多方位治疗糖尿病皮肤溃疡，以期达到更好的疗效。本研究显示，“古汉愈疡方”喷雾剂和凝胶剂均可提高糖尿病大鼠创面收缩率，使用1周后，“古汉愈疡方”凝胶剂提高糖尿病大鼠创面收缩率的能力显著高于“古汉愈疡方”喷雾剂和康复新液，略低于正常大鼠创面愈合能力。HE染色显示，“古汉愈疡方”能促使新鲜肉芽组织增生，毛细血管生长迅速，成纤维细胞数量增多，炎症细胞浸润减少，组织结构紧密，且上述作用以“古汉愈疡方”凝胶剂最为显著，与提高糖尿病大鼠创面收缩率的能力趋势一致，因此，“古汉愈疡方”可有效促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合。

胰岛素样生长因子(insulin like growth factors, IGFs)是一类能促进神经元生长和分化的因子。IGFs的缺乏，会引起神经细胞正常生理再生障碍和病理损伤后修复不良，减少神经的营养支持，导致糖尿

病神经病变发生^[19]。IGF-1是合成IGFs的多肽之一，其参与细胞肉芽形成和再上皮化，促进内皮细胞趋化、促进角质形成细胞和成纤维细胞增殖，从而促进创面愈合^[4]。VEGF是调控血管新生的主要因子，促进血管内皮细胞增殖，诱导新生血管生成，同时可以降解血管周围细胞外基质，增加血管通透性，维持血管内皮细胞完整性，创造有利于肉芽组织生长和创面愈合的环境^[5]。糖尿病患者皮肤组织损伤后，局部VEGF水平下降，是其创面不易修复的重要原因之一。张东萍等^[20]通过糖尿病大鼠实验证明，血竭生肌膏可通过提高溃疡创面VEGF的表达，促进新生血管形成来加快创面愈合。由此可见，IGF-1和VEGF是糖尿病溃疡创面愈合的重要指标。溃疡后的前3周是溃疡愈合的关键时期，本研究显示，糖尿病大鼠皮肤溃疡后的第7、14、21天，“古汉愈疡方”喷雾剂和凝胶剂均可显著上调糖尿病大鼠创面组织中IGF-1、VEGF的蛋白表达，且“古汉愈疡方”凝胶剂提高两个蛋白表达水平的能力均显著强于喷雾剂和康复新液。综上所述，可初步推断糖尿病患者的小血管病变导致溃疡皮肤微循环障碍，创面难以愈合，“古汉愈疡方”在“清热解毒、去腐生肌”基础上加用“益气活血、温阳通络”之品，通过上调IGF-1、VEGF的表达，促进其分泌，从而促进局部血液循环，创造有利于肉芽组织生长的环境，从而加速细胞肉芽形成和再上皮化，也刺激和加速了炎症细胞向伤口床募集，继而促进糖尿病皮肤溃疡创面的愈合。

创面修复是一个复杂的过程，糖尿病慢性皮肤溃疡的愈合更是复杂而漫长。有研究显示，水凝胶作为目前最受欢迎的糖尿病足敷料，可为干燥和脱落的伤口提供液体和良好的水合作用，尤其适用于具有坏死性焦痂的干燥伤口^[21]。将促进创面愈合的相关生长因子制成凝胶剂，可大大地加速创面的愈合。如自体富血小板凝胶不仅具有抗菌活性，还可促进生长因子细胞增殖，加速创面愈合^[22]。又如安宏元等^[23]发现rhEGF凝胶较水剂更能促进糖尿病溃疡创面肉芽组织的形成和再上皮化，明显缩短溃疡愈合时间，加快溃疡面积缩小速度，显著促进溃疡愈合。受此启发，除将古汉愈疡方制成传统的喷雾剂以外，还制作了凝胶剂，通过对比二者的疗效来确定适用于临床的最佳剂型。本研究证明，凝胶剂比喷雾剂疗效更佳，且强于康复新液。凝胶剂优于喷雾剂的原因可能有两点：一是凝胶剂质地均匀，生物黏附性好，易全面铺展于创面，形成一层特有的保护膜，既隔绝了空气，不易滋生细菌，又能使药物的有效成分

充分且持久、缓释地与创面组织相结合,从而加速创面愈合;而喷雾剂虽然吸收迅速,但易蒸发,导致有效成分与创面接触时间较短,所以疗效不如凝胶剂显著。二是凝胶剂有舒缓、安抚伤口的作用,还能保湿、润滑伤口,可大大减轻敷料的直接刺激,防止敷料与溃疡创面粘连,造成二次损伤;而喷雾剂无此作用,每次换药揭开伤口会带有少许血痂,导致伤口再次损伤出血,所以伤口愈合较缓慢。此外,喷雾剂稳定性不佳,不利于储存,洪兵等^[24]经研究证明,中药足浴通过中药经皮吸收和物理温热刺激的双重作用,刺激周围皮肤的血管扩张、血流加速,以调理腠理、畅通血脉、调理脏腑,从而改善循环和周围血管内皮的功能,使药力直达病所,更为有效地改善患肢血液循环,因此,可考虑将喷雾剂作为足浴汤剂,足浴后涂抹凝胶剂,二者配合使用,疗效更佳。基于马王堆汉墓出土的《五十二病方》所创制的“古汉愈疡方”,作为纯中药制剂用于专治糖尿病皮肤溃疡的研究前景十分可观,但其促进糖尿病溃疡创面愈合的分子机制、剂型工艺的优化及临床应用等将有待进一步研究。

参考文献

- [1] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2018, 138: 271-281.
- [2] PATEL S, SRIVASTAVA S, SINGH M R, et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2019, 112: 108615.
- [3] 李炳旻,王芳芳,李倩坤,等.糖尿病溃疡的发生机制与治疗进展[J]. *解放军医学院学报*, 2019, 40(10):992-994.
- [4] BRUHN-OLSZEWSKA B, KORZON-BURAKOWSKA A, GABIG-CIMIŃSKA M, et al. Molecular factors involved in the development of diabetic foot syndrome[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, 59(4): 507-513.
- [5] 宋怡夏,李青,曹卫娟,等.2型糖尿病肾病 VEGF 与 VEGF-A 的表达及治疗后的变化[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2017, 14(1):15-18.
- [6] 毛惠琼,何青云,刘春华.糖尿病足的护理体会[J]. *湖南中医杂志*, 2006, 22(5):68-69, 83.
- [7] 魏启鹏,胡翔骅.马王堆汉墓医书校释(壹)[M].成都:成都出版社, 1992:114-121.
- [8] 叶桐江,郑博文,赵琳,等.链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型的最佳禁食时间与最优剂量[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2019, 45(2):52-55.
- [9] 苗明三,方晓艳,闫晓丽,等.慢性皮肤疮疡动物模型制备规范(草案)[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1):193-197.
- [10] 曹大勇,牛希华,夏成德,等.小鼠糖尿病全层皮肤缺损模型的建立[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2015, 10(6):490-494.
- [11] 吴进,王子龙,张忠勇,等.从郁、瘀、痰、浊论糖尿病微血管病变中医病因病机[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(11):1997-1999.
- [12] 宗文静,郑亚琳,赵凯维,等.从痰瘀论治代谢综合征理论探析[J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(3):113-116.
- [13] 杜文玉,廖勇梅,雷启蓉.金创抗菌膏对糖尿病大鼠皮肤溃疡愈合的影响[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2016, 30(12):1278-1281.
- [14] 胡锦涛,巴元明,丁雷,等.基于络病理论探讨糖尿病足溃疡的中医病机及治疗[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(1):51-53.
- [15] 赵光明,董建勋,李媛,等.回阳生肌方药对糖尿病皮肤溃疡大鼠创面愈合的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37(7):495-499, 506.
- [16] 张臻,阙华发.黄芪多糖与糖尿病创面愈合相关机制研究进展[J]. *中医学报*, 2020, 35(6):1202-1206.
- [17] 余玲,董瑞鸿,宋秋艳,等.黄芪桂枝汤治疗糖尿病足疗效及对患者周围神经感觉阈值、微炎症状态的影响[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2019, 33(1):82-87.
- [18] 雷霆,孙东旭,周军,等.基于 Wnt/ β -catenin 信号通路的三七/白及胶海绵促进糖尿病足溃疡模型大鼠创面愈合的作用机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(4):483-487.
- [19] 饶潇潇,姚广涛,文小平.中药干预糖尿病周围神经病变作用机制研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2017, 24(4):130-133.
- [20] 张东萍,曹建春,鞠上.血竭生肌膏对糖尿病大鼠皮肤溃疡 VEGF、PCNA 表达的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2018, 24(6):737-742.
- [21] 宋渊,刘涛,何志军,等.糖尿病足溃疡治疗研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(18):4612-4616.
- [22] LI T, MA Y, WANG M, et al. Platelet-rich plasma plays an antibacterial, anti-inflammatory and cell proliferation-promoting role in an in vitro model for diabetic infected wounds[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 297-309.
- [23] 安宏元,陈杰翔.重组人表皮生长因子不同剂型作用于糖尿病溃疡动物模型的疗效比较[J]. *中国现代医药杂志*, 2010, 12(10):82-85.
- [24] 洪兵,张翠平,陈耀凯,等.中药足浴辅助西药治疗 2 型糖尿病下肢动脉早期病变临床研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2018, 25(3):19-24.

(本文编辑 匡静之)